

Methylcholanthrene 誘発肉腫細胞表面に存在する 腫瘍関連抗原の局在に関する研究

上野 洋男 今村 正克 石井 良文

札幌医科大学病理学第1講座 (主任 菊地浩吉 教授)

Localization of Tumor-associated Antigens on the Surface of Methylcholanthrene induced Rat Tumor Cells

Hiroo UENO, Masakatsu IMAMURA and Yoshifumi ISHII

Department of Pathology (Section 1), Sapporo Medical College

(Chief: Prof. K. Kikuchi)

The existence of a tumor specific antigen, a histocompatibility antigen, and an embryonic antigen on the surface of tumor cells (KMT-17) induced with 3-methylcholanthrene (MCA) in WKA rat (Winster-King-Aptekman) was serologically demonstrated. We studied the morphological correlation on the location of the above antigens by a double staining method employing immunoelectron microscopy, and using both ferritin-conjugated and peroxidase-conjugated antibodies. Antiserum against a individual-specific tumor antigen was obtained by immunization of syngeneic WKA rats with live KMT-17 tumor cells and by appropriate absorption with other MCA-induced tumor cells. Antiserum against the histocompatibility antigen was obtained by immunization of a Buffalo rat with the spleen cells of a WKA rat. Multiparous rat sera were used as the antisera against the embryonic antigen. At the level of double staining for immunoelectron microscopy, the above antigens were present in partially separated form in the different regions of the surface of KMT-17 tumor cells. This finding was confirmed by a blocking-absorption test, in which neither was completely covered by two other antisera. These results suggest that a tumor-specific antigen may play an important role in the immunological rejection of syngeneic tumor cell transplantation. At least parts of each antigen seemed to be located at different sites on the surface of the KMT-17 tumor cells.

(Received July 19, 1982 and accepted December 13, 1982)

Key words: Methylcholanthrene induced rat tumor cell, Tumor-associated antigens, Double staining, Immunoelectron microscopy

1 緒 言

3-Methylcholanthrene (MCA) 誘発肉腫細胞を syngeneic のラット又はマウスに頻回免疫することにより、これらの動物に、その免疫腫瘍に対する移植免疫を誘発できる¹⁻⁹⁾。この時、移植免疫を獲得した syngeneic の動物の血清中には、腫瘍特異抗原に対する抗体の他、胎児性抗原に対する抗体が存在していることが証明されている⁶⁾。

胎児性抗原は MCA 誘発肉腫細胞の共通抗原として認識されるが、腫瘍特異抗原は、その抽出、精製によ

る生物、化学的同定により、組織適合抗原との異同が論じられている^{3,7,10-16)}。

今回、我々は腫瘍特異抗原、胎児性抗原、そして組織適合抗原、それぞれに対する抗体を用い、免疫電顕二重染色法により、腫瘍細胞表面におけるそれら抗原の位置的関係を通して、三者の抗原の関係を観察した結果、少なくとも、それぞれの抗原の一部は、独立して細胞表面に位置していることを見出した。同時に、二者の抗原の細胞表面における位置的異同を識別するうえで、フェリチン、ペルオキシダーゼを用いた免疫電顕二重染色法は有用な一つの方法となりうる事が確

認された。

2 実験方法

2.1 動物および腫瘍

北大理学部実験動物飼育室において維持されている近交系 WKA (Wister-King-Aptekman) を用いた。

腫瘍として methylcholanthrene (MCA) 5~10 mg を WKA 系ラット皮下に接種して作った KMT-17, KMT-50, KMT-117 を用いた。KMT-17, KMT-50 はその腹水細胞を, KMT-117 はその培養細胞を用いた。

2.2 胎児細胞

mating 1 日で雄を離し, その日からの日数で胎児の日齢を求めた。細胞としては, その胎児を細切後, 0.1% trypsin で single cell とし, それを MEM-medium で培養した primary cultured cells を用いた。培養された細胞の多くは fibroblast で, 一部に上皮性細胞も認められた。

2.3 抗血清

2.3.1 Syngeneic 抗 KMT-17, 抗 KMT-50 血清

KMT-17, KMT-50 両腹水細胞 10^7 個を, それぞれ同系 WKA 系ラット背部皮下に移植後, 拇指頭大になったところで, 腫瘍を結紮解放し, その後 5 回背部皮下に $10^7 \sim 10^8$ 個の腫瘍細胞を 1 週間隔で追加免疫し, 最終免疫から 1 週間後に採血し, syngeneic の抗 KMT-17 および抗 KMT-50 血清を得た。これらの抗血清の抗体価は cytotoxic test によると, それぞれ 64 倍であった。

2.3.2 抗ラット組織適合抗原 (抗 R^w)

WKA 系ラット脾細胞 10^8 個を Buffalo 系ラット腹腔内に 1 週間隔で 4~5 回免疫し, その 1 週間後に採血した。リンパ球を標的としたその cytotoxicity は 128 倍であった。

2.3.3 多産ラット血清

4~5 回以上の多産 WKA 系ラット血清を検索し, KMT-17, KMT-50 両腫瘍細胞に対し, 4 倍から 16 倍の cytotoxicity を示したものを抗胎児性抗原血清として用いた。

2.4 血清学方法

2.4.1 Cytotoxic test

マイクロプレートを用い, 3×10^6 /ml の腫瘍細胞, 抗血清, 補体としてモルモット血清をそれぞれ 0.025 ml ずつ加え, 37°C, 45 分間反応させ, 死細胞を trypan blue dye exclusion で判定した。その cytotoxic index は [(実験可染% - 対照可染%) / (100 - 対照可

染%)] として求めた。

2.4.2 間接膜蛍光抗体法

Möller¹⁷⁾ の方法に準じた。 5×10^6 /ml の腫瘍細胞 0.1 ml をとり, 遠心で細胞を分離し, それに抗血清を 0.1 ml 加え, 4°C で 1 時間反応させた。細胞を 3 回洗浄した後, FITC 結合ウサギ抗ラット IgG (Miles Lab.) を 0.1 ml 加え, さらに 4°C で 1 時間反応させ, 洗浄後グリセリン buffer に浮遊させ鏡検, その fluorescent index は cytotoxic index と同様の方法で求めた。

2.4.3 Blocking-absorption test

Bachvaroff and Rapaport¹⁸⁾ の方法に準じた。この方法により, 腫瘍細胞表面上の組織適合抗原と, 腫瘍特異抗原および共通抗原としての胎児性抗原を合せた腫瘍関連抗原との関係を調べた。KMT-17 腫瘍細胞を抗組織適合抗原血清で, 45 分間, 4°C で反応させ, KMT-17 腫瘍細胞表面上の組織適合抗原を被覆した。

次に, この被覆細胞で, syngeneic の抗 KMT-17 血清を吸収し, この吸収抗血清の抗体活性の変化を KMT-17 腫瘍細胞を標的として cytotoxic index として求めた。同様に, KMT-17 腫瘍細胞に syngeneic の抗 KMT-50 血清を反応させることにより, KMT-17 腫瘍細胞上の共通抗原を覆い, その腫瘍細胞で, 抗 KMT-17 血清を吸収し, 吸収抗血清の KMT-17 腫瘍細胞に対する抗体活性の変化から, individual specific の KMT-17 腫瘍特異抗原が共通抗原によって覆われているかどうかを調べた。

2.5 電顕二重染色法

2.5.1 家兎抗ラット IgG 抗体の Fab の分離

家兎抗ラット IgG 抗体の作製は DEAE column chromatography により精製したラット IgG を家兎に免疫することにより作製した。家兎抗ラット IgG の精製も同様の方法によった。Fab の分離は Porter¹⁹⁾ の方法に従った。5.8 ml の 0.1 M phosphate buffer (pH 7.5) のなかに, 100 mg の蛋白, 0.002 M EDTA, 0.01 M L-cysteine, 0.5 mg の papain を加え, 窒素ガスを通した後, 16 時間, 37°C で incubate した。消化後, 4°C で 48 時間, 蒸留水に対して激しく攪拌しながら透析した。生じた Fc 結晶を取り除き, 0.01 M sodium acetate buffer (pH 5.5) に平衡化した CM セルロースで 0.9 M sodium acetate buffer (pH 5.5) までの gradient solution による溶出を行った。溶出してきた Fab フラグメントをアミコンにより濃縮し実験に供した。

2.5.2 Peroxidase の標識

Abrameas の glutaraldehyde 用いる方法²⁰⁾によった。20 mg の Fab 抗体蛋白を 2 ml の phosphate buffer saline (以下 PBS とする)に溶かし、それに 20 mg の peroxidase (Sigma, type VI) を加え、静かに攪拌しながら、精製した 1.0% glutaraldehyde 0.1 ml を加え、室温で 2 時間反応させた。

反応後、沈澱を除去し、すぐに sephadex G 200 カラムを通し、未反応抗体蛋白および未反応 peroxidase を除去し、濃縮後使用した。

2.5.3 フェリチンの標識

glutaraldehyde を用いて標識した。抗体蛋白 40 mg とフェリチン 80 mg (Pentax, 6 回結晶)とを 2 ml の PBS に溶かし、静かに攪拌しながら精製した 1.0% glutaraldehyde 0.1 ml を加える。そのまま室温で 1.5 時間攪拌し、その後 8 ml の PBS を加え、沈澱を遠心除去し、60% sucrose-bed を用いて、100,000 g, 1.5 時間の超遠心で未結合抗体蛋白を除去した。

2.5.4 免疫電顕二重染色法の実際

KMT-17 腫瘍細胞と syngeneic の抗 KMT-17 血清を 4℃で 45 分間反応させ、RPMI 溶液で 3 回洗浄した。次に peroxidase 標識家兎抗ラット IgG (Fab) 抗体を加え、45 分間、4℃で反応させた。再び、3 回洗浄した後、Graham & Karnovsky の方法²¹⁾に準じ、peroxidase 呈色反応を行った。つまり 0.1 M tris buffer 10 ml (pH 7.6) に DAB 2.5 mg, 1% H₂O₂ 0.1 ml を加え、2 分間細胞を室温で反応させ発色を行った。発色後の細胞を RPMI で希釈し、更に 2 回細胞を洗浄した。これで、腫瘍関連抗原が DAB の反応物として識別されたことになる。次に、二次抗体と結合していない syngeneic の抗 KMT-17 抗体の結合手を被覆する目的で、無標識の Fab 二次抗体を更に 30 分間反応させた。二段階目の反応に移るために、腫瘍細胞を RPMI で 3 度洗浄後、抗組織適合抗原血清を 4℃で 45 分間反応させ、洗浄後、フェリチンを標識した家兎ラット IgG (Fab) 抗体を、再び 4℃で 45 分間反応させた。RPMI で洗浄した後、細胞を遠心によりペレットとし、2.5%

glutaraldehyde で固定、更にオスミウム酸で後固定し、通常のごとく脱水後、エポキシ樹脂に包埋した。なおコントロールとして、一次抗体のかわりに、正常ラット血清を用い、また二次抗体を無標識抗体で block したのち、標識抗体と反応させた。同様に、individual specific の KMT-17 抗原と共通抗原としての胎児性抗原との関係を調べた。

3 成 績

3.1 KMT17腫瘍特異抗原(individual specific) の証明

Table 1 に示したように、syngeneic 抗 KMT-17 血清を KMT-50 腫瘍細胞 5×10^8 /ml で吸収すると、KMT-17 腫瘍細胞とのみ反応する抗体を得る。これを individual specific 抗 KMT-17 血清とした。この吸収後の抗血清は Table 2 に示すように KMT-117 および 16 日胎児培養細胞とも交叉しなかった。この事実を確かめるため、KMT-17 腫瘍細胞を抗 KMT-50 血清と反応させ、KMT-17 細胞表面にある交叉抗原を抗体で覆い、その細胞で抗 KMT-17 血清を吸収した。

結果は、Table 3 のように、61%の吸収効果を示した。これは、抗 KMT-50 血清では覆われない抗原が存在することを示し、individual specific KMT-17 特異抗原の存在が、この blocking-absorption test でも確認されたことになる。

3.2 Peroxidase, ferritin を使った免疫電顕二重染色法による観察

KMT-17 腫瘍細胞表面に存在する組織適合抗原、individual specific KMT-17 腫瘍特異抗原、胎児性抗原の関係をみるため、免疫電顕二重染色法を行った。先ず最初に、組織適合抗原と抗 KMT-17 血清で識別される腫瘍関連抗原との関係を Fig. 1a, b に示した。両者とも patchy あるいは spotty に細胞表面上に位置し、一部は別個の位置に観察され、両者がモザイク状に配列する場合も認められた。なお、この抗 KMT-17 血清には、individual specific の腫瘍特異抗原と胎児性抗

Table 1 Absorption of syngeneic KMT-17 immune serum by KMT-17 and KMT-50 tumor cells

target cell	Fluorescent index following absorption on				
	unabsorption serum	KMT-17 1×10^8 /ml	KMT-17 5×10^8 /ml	KMT-50 1×10^8 /ml	KMT-50 5×10^8 /ml
KMT-17	0.90	0	0.02	0.83	0.66
KMT-50	0.67	nd	nd	nd	0

Table 2 *Fluorescent index of syngeneic KMT-17 immune serum against KMT-117 tumor cells and embryonic cells*

target cells	KMT-17 immune serum	individual specific anti KMT-17 serum
KMT-117 tumor cells	0.30	0
embryonic cells	0.75	0

1. Individual specific anti KMT-17 serum: syngeneic KMT-17 immune sera were absorbed with KMT-50 tumor cells (5×10^8)
2. Embryonic cells: primary cultured cells of a 15-day old embryo.

Table 3 *Fluorescent index of syngeneic KMT-17 immune serum absorbed on KMT-17 tumor cells coated with KMT-50 immune serum*

coated sera	No. of cells (/ml)	
	5×10^8	10^8
syngeneic		
Anti-17	0.81	0.83
Anti-50	0.32	0.62
uncoated	0	0.24

原に対する抗体が含まれていることが考えられている。次に individual specific KMT-17 腫瘍特異抗原と胎児性抗原との関係を調べたものが Fig. 2a, b である。同様に両者の抗原は一部離れて存在した。コントロールとして、第二段目の一次抗体の代りに正常血清を用いたもの (Fig. 3a), 又標識二次抗体の反応前に、非標識の二次抗体, すなわち家兎抗ラット IgG を反応させる blocking を行ったが, ferritin による標識は観察されなかった (Fig. 3b)。

3.3 Blocking-absorption test による組織適合抗原と KMT-17 腫瘍関連抗原の関係

Blocking-absorption test の結果を Table 4 に示した。抗組織適合抗原血清を KMT-17 腫瘍細胞と反応させることによって、組織適合抗原を覆い、その覆った細胞で syngeneic の抗 KMT-17 血清を吸収したところ、吸収活性の低下は認められなかった。この方法によっても、組織適合抗原と、腫瘍特異抗原と胎児性抗原からなる共通抗原を含んだ腫瘍関連抗原は、同一分子上には存在していないことが確かめられた。

4 考 察

我々は、免疫電顕二重染色法および blocking-absorption test により、KMT-17 腫瘍細胞表面に存在する組織適合抗原, individual specific 腫瘍特異抗

Table 4 *Cytotoxic index of syngeneic KMT-17 immune serum absorbed on KMT-17 tumor cells coated with anti histocompatibility antigen serum (anti-R^w)*

absorption	dilution of absorbed antiserum			
	2×	4×	8×	16×
unabsorption	74	74	57	23
uncoating	0	0	0	0
coated by				
anti-R ^w	0	0	0	0
anti-R ^w and Rab. anti-rat IgG	0	4	0	0

KMT-17 immune sera were absorbed on cells of 5×10^8 /ml

原, 胎児性抗原の少なくとも一部は, それぞれ別個の位置に存在し, 免疫細胞による抗原認識が独立して行なわれている可能性を明らかにした。

最近, individual specific の腫瘍特異抗原と共通抗原としての胎児性抗原とを含んだ腫瘍関連抗原と組織適合抗原の関係につき興味を持たれ, 多くの報告がなされている。Fujimoto *et al.*¹⁰⁾ によると, 担癌動物の流血中に存在する抗原を syngeneic の動物の抗腫瘍血清を用いたアフィニティークロマトグラフィーで精製すると, その精製腫瘍関連抗原には組織適合抗原を含んでいたという。また一方, 腫瘍細胞に含まれる組織適合抗原と腫瘍関連抗原の量とは逆相関になっていることを, Tsakraklides *et al.*²²⁾ がウイルス性腫瘍を用い, Haywood and Mckhann²³⁾ は MCA 誘発腫瘍を用いて証明した。更に最近, Klein *et al.*¹⁴⁾ は, MCA 誘発腫瘍と自然発癌腫瘍の hybrid cell を用いて, 腫瘍関連抗原は組織適合抗原の modification されたものであり, しかもその発現, 合成が H-2 locus により規制されているという可能性を示唆した。一方, Natori *et al.*⁷⁾ は MCA で誘導した腫瘍細胞表面から, 移植免疫

の成立を規定する抗原を精製したところ、組織適合抗原とは異なる抗原物質を得たということを報告している。

これとは別に, Comoglio *et al.*²⁴⁾ は、腫瘍関連抗原としての胎児性抗原と腫瘍特異抗原とが、同じ molecule に locate していることを抗原抽出および抗原の redistribution から明らかにした。

このように細胞の腫瘍化に伴って表われてきた免疫学的に重要な変化の一つである腫瘍関連抗原が、何によって規制され、どのようなものとして細胞表面上に位置しているかは大きな問題である。同一発癌剤の使用においても、発生してくる腫瘍細胞に発現する腫瘍関連抗原の抗原性には違いがあることが知られ、また同時に、その抗原性の強さにも異同があることが広く認められている。MCA 肉腫に関しては Takeda *et al.*²⁵⁾ により、移植免疫誘導の違いから HAT (high-antigenic tumor) MAT (moderate-antigenic tumor), LAT (low-antigenic tumor) の分類がなされている。このうち、HAT 腫瘍では、胎児性抗原が多くみられ、しかも、胎児性抗原と individual specific の腫瘍特異抗原の抗原活性の強さに差が存在すると言われている²⁾。HAT 腫瘍である KMT-17 腫瘍で、上の三種の抗原がいかなる関係を持って細胞表面に分布、局在しているかは、移植免疫誘導と深くかかわっているという点からも興味を引く。今回我々は、免疫電顕二重染色法を用いることにより、組織適合抗原、腫瘍特異抗原、胎児性抗原の少なくとも一部は、それぞれ別個の位置に存在することを証明した。なお、この方法では抗原の局在が同一部位の場合に、これを同定することは不可能であり、その可能性も残るということを銘記しておく必要がある。以上の結果は腫瘍関連抗原の一部は組織適合抗原と異なる腫瘍特異抗原としての分化をとげ、胎児性抗原とともに腫瘍細胞表面上に存在することを示していると思われる。この事実が、ラットにおける MCA 誘発腫瘍以外にも認められるものであるかどうかは今後検討されねばならない。

なお、今回われわれの用いた免疫電顕二重染色法で注意しなければならぬが、Raff²⁶⁾ のいう細胞表面における、抗体による抗原の分布の人為的变化と再分布の問題である。彼らは染色に用いる抗体を一価にするか、二価にするかによって、リンパ球表面のグロブリンの分布に違いがみられると述べている。我々は、未固定の細胞に間接法を用いて染色を行っており、染色経過中に人為的な表面抗原分布の変化がおこる可能性は否定しきれない。しかし、今回の免疫電顕二重染色法は、二

種類の抗原を同時に見うという大きな利点を持ち、たとえ細胞表面抗原の人為的变化があったにしても、その際は2種類の抗原は常に同時に同方向に移動するはずであり、少なくとも2種類の抗原の位置的異同を区別することができる。また、この腫瘍細胞は、上述の3種類の抗原に関し、それぞれ10~20%の capping 現象しか起こさないことは確かめており、今回の実験操作のすべてが4℃で行なわれたという点からも、細胞膜の流動による新たな抗原の出現はあり得ないと考えている。

5 結 論

WKA 系ラットに MCA で誘発した腫瘍細胞(KMT-17)表面に存在する組織適合抗原、腫瘍特異抗原、胎児性抗原の位置的異同を知るため、ペルオキシダーゼ、フェリチンを使った免疫電顕二重染色法を試みた。抗組織適合抗原血清は、Buffalo 系ラットを WKA 系ラット脾細胞で免疫することにより得た。腫瘍特異抗原に対する抗血清は syngeneic の WKA 系ラットを KMT-17 腫瘍細胞でくり返し免疫し、その抗血清を他の MCA 誘発腫瘍で吸収することによって得、それを individual specific の抗腫瘍特異抗原とした。抗胎児性抗原血清としては多産ラット血清を用いた。これらの抗血清を用いて、対応する抗原の位置的关系を免疫電顕二重染色法で確かめたところ、組織適合抗原、腫瘍特異抗原、胎児性抗原とも spotty に細胞表面に位置し、少なくともその一部は細胞表面の別の位置に存在することがわかった。この事実を確かめるため、blocking-absorption test を行った。つまり、それぞれ一種の抗体で覆った KMT-17 腫瘍細胞で、他種の抗体を吸収したところ、吸収活性の低下は認められず、この方法によっても、三者は同一分子上に存在していないことが確かめられた。この結果は、三種の抗原が、少なくとも一部は独立して存在していることを意味している。

文 献

1. 中村恭二, 相沢 幹, 菊地由生子, 武田勝男: ラット腫瘍の同系移植免疫に関する研究。癌の免疫病理 1, 23-27 (1965)。
2. 中村恭二: ラットのメチールコラントレン肉腫の抗原共通性。癌の免疫病理 3, 28-35 (1967)。
3. 名取 孝: ラットのメチールコラントレン誘発肉腫の腫瘍特異的移植抗原の分析について。移植 7, 1-8 (1972)。
4. 石山 紘: ラット MC 肉腫の腫瘍特異的移植免疫

における腫瘍特異的抗体の膜蛍光抗体法的検索. 移植 8, 117-125 (1973).

5. Thomson D. M. P., Sellens V., Eccles S. and Alexander P.: Radioimmunoassay of tumour specific transplantation antigen of a chemically induced rat sarcoma: Circulating soluble tumour antigen in tumour bearers. *Br. J. Cancer* **28**, 377-388 (1973).
6. Thomson D. M. P. and Alexander P.: A cross-reacting embryonic antigen in the membrane of rat sarcoma cells which is immunogenic in the syngeneic host. *Br. J. Cancer* **27**, 35-47 (1973).
7. Natori T., Law L. W. and Appella E.: Biological and biochemical properties of Nonidet P40-solubilized and partially purified tumor-specific antigens of the transplantation type from plasma membranes of a methylcholanthrene-induced sarcoma. *Cancer Res.* **37**, 3406-3413 (1977).
8. Natori T., Law L. W. and Appella E.: Immunochemical evidence of a tumor-specific surface antigen obtained by detergent solubilization of the membranes of a chemically induced sarcoma, Meth-A. *Cancer Res.* **38**, 359-364 (1978).
9. Parmiani G., Meschini A., Invernizzi G. and Carbone G.: Tumor-associated transplantation antigen distinct from H-2^k-like antigen on a Balb/c (H-2^d) fibrosarcoma. *J. Natl. Cancer Inst.* **61**, 1229-1234 (1978).
10. Fujimoto S., Chen C. H., Sabbadini E and Sehon A. H.: Association of tumor and histocompatibility antigens in sera of lymphoma-bearing mice. *J. Immunol.* **111**, 1093-1100 (1973).
11. Davies A. L., Baugh V. S. G., Buckham S. and Manstone A. J.: Separation of the specific antigen of a mouse lymphoma from histocompatibility antigens. *Eur. J. Cancer* **10**, 781-786 (1974).
12. Invernizzi G. and Parmiani G.: Tumour-associated transplantation antigens of chemically induced sarcomata cross reacting with allogeneic histocompatibility antigens. *Nature* **254**, 713-714 (1975).
13. Bowen J. G. and Baldwin R. W.: Tumour-specific antigen related to rat histocompatibility antigens. *Nature* **258**, 75-76 (1975).
14. Klein G. and Klein E.: Are methylcholanthrene-induced sarcoma-associated, rejection-inducing (TSTA) antigens, modified forms of H-2 or linked determinant? *Int. J. Cancer* **15**, 879-887 (1975).
15. Martin W. J. and Gipson T. G.: H-2^a-associated alloantigen expressed by several transplacentally-induced lung tumours of C3Hf mice. *Nature* **265**, 738-739 (1977).
16. Flaherty L. and Rinchik E.: No evidence for foreign H-2 specificities on the EL4 mouse lymphoma. *Nature* **273**, 52-53 (1978).
17. Möller G.: Demonstration of mouse isoantigens at the cellular level by the fluorescent antibody technique. *J. Exp. Med.* **114**, 415-434 (1961).
18. Bachvaroff R. and Rapaport F. T.: Blocking of HL-A antigenic sites by species-specific antihuman heteroantisera. *Transplant. Proc.* **5**, 453-456 (1973).
19. Porter R. R.: The hydrolysis of rabbit γ -globulin and antibodies with crystalline papain. *Biochem. J.* **73**, 119-126 (1959).
20. Avrameas S.: Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies. *Immunochemistry* **6**, 43-52 (1969).
21. Graham R. C. and Karnovsky M. J.: The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: Ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J. Histochem. Cytochem.* **14**, 291-302 (1966).
22. Tsakraklides E., Smith C., Kersey J. H. and Good R. A.: Transplantation antigens (H-2) on virally and chemically transformed BALB/3T3 fibroblasts in culture. *J. Natl. Cancer Inst.* **52**, 1499-1504 (1974).
23. Haywood G. R., and Mckhann C. F.: Antigenic specificities on murine sarcoma cells. Reciprocal relationship between normal transplantation antigens (H-2) and tumor-specific immunogenicity. *J. Exp. Med.* **133**, 1171-1187 (1971).
24. Comoglio P. M., Bertini M. and Forni G.: Evidence for a membrane carrier molecule common to embryonal and tumor-specific antigenic determinants expressed by a mouse transplantable tumour. *Immunology* **29**, 353-364 (1975).
25. Takeda K., Aizawa M., Kikuchi Y., Yamawaki S. and Nakamura K.: Auto immunity against methylcholanthrene-induced sarcomas of the rat in the autochthonous host. *Gann* **57**, 221-240 (1966).
26. Raff M. C.: Cell-surface immunology. *Sci. Am.* **234**, 30-39 (1976).

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西17丁目

札幌医科大学病理学第1講座 上野洋男

Explanation of Figures

- Fig. 1a** Double labeling of tumor-associated antigen with Fab-peroxidase and histocompatibility antigen with Fab-ferritin on the surface of a KMT-17 tumor cell. ($\times 54,000$, Unstained)
- Fig. 1b** Double labeling of tumor-associated antigen with Fab-ferritin and histocompatibility antigen with Fab-peroxidase on the surface of a KMT-17 tumor cell. ($\times 54,000$, Unstained)
- Fig. 2a** Double labeling of individual-tumor specific antigen with Fab-peroxidase and embryonic antigen with Fab-ferritin on the surface of a KMT-17 tumor cell. ($\times 54,000$, Unstained)
- Fig. 2b** Double labeling of individual-tumor specific antigen with Fab-ferritin and embryonic antigen with Fab-peroxidase on the surface of a KMT-17 tumor cell. ($\times 68,000$, Unstained)
- Fig. 3a** Control of double labeling. KMT-17 tumor cells were incubated with normal rat serum instead of KMT-17 tumor specific antiserum as a first antiserum of second step. Peroxidase: Histocompatibility antigen. ($\times 68,000$, Unstained)
- Fig. 3b** Blocking control of double labeling. The KMT-17 tumor cell surface was previously blocked with unlabeled rabbit anti-rat IgG before being incubated with ferritin labeled rabbit anti-rat IgG (Fab). Peroxidase: Histocompatibility antigen. ($\times 68,000$, Unstained)

